Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 2, Summer 2020, p. 251-264

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۶۴-۲۵۱

مقاله علمی- پژوهشی

شناسایی ژن‌های میتوکندریایی تأثیرگذار بر تکامل سلول تخم تحت هورمون FSH با استفاده از داده‌های ریز آرایه در گاو

گلزار فرهادی[۱]، هدایت الله روشنفکر[۲*]، جمال فیاضی[۳]، محمود نظری[۴]، الهام بهدانی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲

چکیده

بلوغ تخمک شامل بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی است که هر دو برای لقاح و نمو رویان اهمیت دارد. برخلاف بلوغ هسته‌ای، بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت را نمی‌توان به راحتی ارزیابی کرد. با توجه به توزیع مجدد برخی اندامک‌ها از جمله میتوکندری در زمان بلوغ می‌توان آن را به عنوان شاخص بلوغ سیتوپلاسمی در نظر گرفت. در این مطالعه به منظور بررسی اثر هورمون FSH در شرایط آزمایشگاهی بر چگونگی بیان ژن‌های میتوکندریایی، داده‌های ریزآرایه حاوی اطلاعات بیان ژن سلول‌های اووسیت گاو، با کد دسترسی GEO (GSE38345) استفاده گردید. آنالیز و مقایسه بیان ژن‌ها در دو حالت قبل و بعد از بلوغ به ترتیب (۲۰ و ۹۶ ساعت بعد از تیمار) با استفاده از لینک نرم‌افزاری GEO2R، دو گروه ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته را تعیین نمود. برهمکنش گروه‌های ژنی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی string، مجسم‌سازی شبکه با استفاده از نرم‌افزار cytoscape و هستی‌شناسی شبکه با استفاده از پایگاه اطلاعاتی comparative GO انجام گردید. در شبکه برهمکنش پروتئینی مربوط به ژن‌های افزایش بیان یافته، ژن‌های مهم MRPS10، MRPS18A، MRPL16 و MRPL17 که در فرایندهای انهدام میتوکندری و ترجمه ژن‌های این اندامک و در شبکه ژن‌های کاهش بیان یافته، ژن‌هایMRPL22، ATP5B و ATP5C1 که با کاهش بیان خود، سعی در ایجاد تعادل در مسیرهای مرتبط با انهدام میتوکندری و تولید ATP از طریق نقش در ساختار ATP سنتتاز، داشتند. در این مطالعه ژن‌های تنظیم کننده و همچنین مسیرهای بیولوژیکی مؤثر به منظور درک ساز و کار اثر هورمون FSH بر روند بلوغ اووسیت از طریق اندامک میتوکندری بررسی گردیده است.

واژه‌های کلیدی: تکامل سلول تخم، داده‌های ریزآرایه، ژن‌های میتوکندریایی، هورمون FSH.

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر به ایجاد روش‌های نوین تولیدمثل انجامیده است که به کمک آن‌ها می‌توان فرآیندهای تولیدمثلی را بهبود بخشید و یا مهار نمود. پیشرفت‌های اندک در بازدهی تولیدمثل می‌توانند تأثیر شایان توجهی بر بازدهی تولید فرآورده‌های دامی بگذارند. با بهبود صفات تولیدی مانند نرخ رشد، تولید شیر و مانند آن‌ها، فشارهای فیزیولوژیک و متابولیک بر دام افزوده می‌شود. بنابراین، حفظ بازدهی بالای تولیدمثلی در آینده، دشوارتر خواهد شد و داشتن روش‌های مؤثر بر فرآیندهای تولیدمثلی در آینده، بسیار ضروری می‌نماید. با بروز تکنولوژی‌هایی که در یک آزمایش تعداد زیادی داده (تکنولوژی برون‌ده بالا[۶]) در اختیار محقق قرار می‌دهند؛ مباحث وارد عرصه جدیدی شد. مهم‌ترین این تکنولوژی‌ها، تکنولوژی ریزآرایه و در سال‌های اخیر RNA-seq می‌باشد که باعث شد فاز دیگری از پیشرفت در روش‌های سیستمی برای ارگانیسم‌های پیچیده مثل پستانداران گشوده شود (۳۵). در دهه گذشته، با توانایی به مطالعه در اطلاعات ژنتیکی ژنوم در دامنه گسترده، ریزآرایه‌ها روشی با توان عملیاتی بالا به منظور تجزیه و تحلیل‌های بیان ژن به حساب آمدند .فناوری ریزآرایه روشی کم هزینه، مؤثر و پربازده می‌باشد و با استفاده از این تکنیک می‌توان به طور همزمان بیان هزاران ژن را در حداقل زمان ممکن انجام داد و در سال‌های اخیر موجب تولید حجم انبوهی از داده‌های بیان ژنی شده است. مطالعات کمی در زمینه فراوانی mRNA در اووسیت‌های گاو در مراحل مختلف با استفاده از رویکرد

۱و ۵ - دانش آموخته دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین، خوزستان، ایران.
۲- استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین ، خوزستان، ایران
۳-دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین، خوزستان، ایران.
۴-استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین، خوزستان، ایران.
(*- ایمیل نویسنده مسئول: roshanfekr_hd@cua.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i2.73776

6- High throughput technology

ریزآرایه[1] انجام شده است. اووسیت‌های پیش از بلوغ را با مرحله وزیکول ژرمینال‌های بالغ با تکنیک ریزآرایه مقایسه کردند و نشان دادند که تقریبا ۲۰۰ ترانسکریپتوم در این مقایسات متفاوت بودند (۳۲). تأثیر وضعیت فولیکولی را با استفاده از ریزآرایه cDNA مطالعه کردند و ۵۱ ژن که سطح mRNA آن‌ها بین اووسیت‌های بدست آمده در فاز رشد در مقایسه با فاز چیرگی[2] تفاوت بیانی داشتند را شناسایی کردند (۱۴). در مطالعه‌ای که توسط نیوت و همکاران(۲۰۱۲) انجام شد، زمان‌های بازگیری مختلف منجر به کیفیت‌های متفاوت اووسیت می‌شد که میزان آن در ۲۰ ساعت اول و ۹۲ ساعت آخر دوره بازگیری در مقایسه با کیفیت بالای مشاهده شده در دوره زمانی میانی (۴۴ تا ۶۸ ساعت) کمتر بود (۲۹).

یکی از جایگاه‌های مهم و تأثیرگذار بر عملکرد سلول‌ها، اندامک میتوکندری می‌باشد. در مطالعات مختلف مشخص گردیده که بلوغ تخمک شامل بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی است که هر دو برای لقاح و نمو رویان اهمیت دارد (۳۸). بلوغ سیتوپلاسمی شامل توزیع مجدد یک سری از اندامک‌ها از جمله میتوکندری می‌باشد (۱۲). مطالعات نشان دادند، تغییر در الگوی توزیع میتوکندری می‌تواند روی توانایی نمو جنین حاصل از تخمک‌ها اثرگذار باشد (۳). با بلوغ اووسیت، نیاز به تأمین انرژی بیشتر می‌شود. انرژی در زمان تخمک‌گذاری به اوج می‌رسد (۱۳). از آنجایی که همانندسازی میتوکندری جنین تا پس از مرحله بلاستوسیت انجام نمی‌شود، تخمک‌های بالغ (MII)، تخمک‌های بارور شده و جنین‌های اولیه وابسته به ذخیره میتوکندری موجود در زمان تخمک‌گذاری می‌باشند. جنین‌ها در روزهای اول رشد خود برای تأمین انرژی مورد نیاز خود از میتوکندری موجود در تخمک استفاده می‌کنند. نقش مهم فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری و تولید ATP در طی مراحل اولیه رشد جنین در بسیاری از گونه‌ها از جمله انسان‌ها نشان داده شده است (۱۶). مطالعات بسیار اندکی در رابطه با چگونگی اثر میتوکندری و ژن‌های آن در بلوغ اووسیت انجام شده است. مشاهدات محققان نشان می‌دهد در تخمک در مرحله وزیکول ژرمینال به علت این که برای شکستن غشای هسته و شروع تقسیم میوزی نیاز به صرف انرژی است، بنابراین در اطراف هسته تعداد میتوکندری افزایش می‌یابد و پراکندگی غیر یکنواختی مشاهده می‌شود. اما بعد از تقسیم میوز یعنی زمانی که غشای هسته ناپدید شد، چون تقریباً در تمام سیتوپلاسم نیاز یکسانی وجود دارد، پراکندگی یکسان میتوکندری مشاهده می‌شود. در تحقیق دیگری با بررسی پراگندگی‌های میتوکندری تخمک‌های بالغ و نابالغ گاو نشان داده شده که بیش از ۸۰ درصد از تخمک‌های مرحله میوز II دارای الگوی یکنواخت بوده و این گروه از تخمک‌ها پس از IVF تکوین جنین بهتری نیز داشتند (۳۸).

در مطالعه‌ای نیشی و همکارانش نیز نشان دادند که تخمک‌های بلوغ یافته موش در محیط کشت در مرحله GV-GVBD که الگوی غیر یکنواخت میتوکندری با پراکندگی دورهسته‌ای نشان داده بودند، تکوین بهتری داشتند و در نتیجه مشخص گردید که تجمع میتوکندری دور هسته‌ای برای بلوغ لقاح و تکوین جنین‌های حاصل ضروری و لازم است (۲۸). ناگایی و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که تخمک‌های مرحله میوز II با آرایش میتوکندری دور هسته‌ای تکوین بهتری در مقایسه با تخمک‌هایی با میتوکندری‌های قطعه قطعه شده نشان دادند در نتیجه پراکندگی میتوکندری به عنوان یک فاکتور انتخاب تخمک خوب و با کیفیت مطرح نمودند (۲۵).

مبحث شبکه‌های ژنی کمک می‌کند مهم‌ترین ژن‌ها را در یک فرآیند فیزیولوژیک مورد بررسی قرار داد. برای ساخت و بازسازی شبکه بیولوژی از تئوری گراف استفاده می‌گردد. در شبکه‌های بیولوژی ژن‌ها، پروتئین‌ها و یا هر مولکول دیگری که در سلول نقشی ایفا می‌کند، می‌تواند به عنوان گره یا نود تلقی شده و ارتباط بین این گره‌ها به عنوان یال در نظر گرفته می‌شود. اطلاعات مربوط به نحوه ارتباط بین ژن‌ها و پروتئین‌ها در پایگاه داده‌های متنوعی بر اساس نوع شبکه‌ها ذخیره‌سازی شده‌اند (۲). علاوه بر این به منظور کاوش این ارتباطات الگوریتم‌های مختلفی توسعه یافته است (۴).

در مطالعه‌ای که لیوو و همکاران (۲۰۱۶) در رابطه با شبکه‌های بیان ژنی در بیماری عروق کرونر (CAD) برای درک مکانیزم‌های مولکولی این بیماری انجام دادند، آن‌ها، در این مطالعه، مهم‌ترین ماژول مرتبط با مسیرهای کاردیومیوپاتی را بدست آوردند. علاوه بر این، ۳۰ ژن با بیان بالا معرفی شدند و دو ژن G6PD وS100A7 به عنوان مولکول‌های کلیدی در این بیماری مشخص گردیدند (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر یودین و همکاران (۲۰۱۷) بر روی بیماری کاهش عملکرد طبیعی مغز از جمله اختلال‌های یادگیری که در بعضی از افراد مشاهده می‌شود، انجام دادند. این مطالعه با هدف درک بهتر مکانیزم‌های مولکولی در اختلال یادگیری مرتبط با سن (ASLI) انجام شده است. در این مطالعه از یک مدل‌سازی ریاضی که در تحلیل شبکه همبستگی ژن Weighted Gene (WGCNA) کاربرد دارد، استفاده گردیده است. برای ایجاد و مقایسه مدل‌های شبکه ژنی از داده‌های مرتبط مغز جوان و مغز بزرگسالان در موش صحرایی استفاده گردید. هدف اصلی شناسایی ژن‌های جدید ASLI و شبکه‌های آن‌ها براساس رابطه هم‌بیان ژن ها بود. این تجزیه و تحلیل مجموعه‌ای از ماژول‌های شبکه را در جوانان شناسایی کرد که هر کدام از آن‌ها شامل ژن‌هایی متنوع و متمایز و با کاربردی بیولوژیک متفاوت، طبقه‌بندی گردیدند. در این مطالعه یک ماژول واحد که شامل ژن‌های مرتبط در مسیرهای مرتبط با یادگیری بود مشخص گردید. تجزیه و تحلیل شبکه این مدل ماژول یادگیری و حافظه در

1- Microarray
2- Dominance

موش‌های سالم در مقایسه با موش‌های ناسالم به ما اجازه می‌دهد مجموعه‌ای از ژن های مهم را در ASLI را شناسایی کنیم. عملکرد شناخته شده این ژن‌ها و نقش کلیدی آن‌ها در مسیرهای مهم، از جمله فعالیت کیناز و فسفاتاز، عملکرد مربوط به کانال‌های یونی و حفظ یکپارچگی عصبی در تشکیل حافظه زمینه برای درک بهتر این اختلال فراهم می‌سازد (۴۰). در مطالعه‌ای مدینا و همکاران (۲۰۱۶) شبکه‌های هم‌بیانی در مورد بیماری دیابت نوع ۱ مورد بررسی قرار دادند. با تجزیه و تحلیل شبکه مبتنی بر تعاملات بین ژن‌ها یا پروتئین های خاص دیابت، ماژول‌های شبکهٔ ژن ارتباطی REL همراه با T1Dکشف شد که به نوبه خود پایه‌ای برای شناسایی مسیرهای بالقوه و ژن‌های نشانگر زیستی که ممکن است در توسعه T1D دخالت داشته باشد، فراهم گردید (۳۴).

در این مطالعه با استفاده از داده‌های بیان ژن به مطالعه اثر هورمون FSH در الگوی بیان ژن‌های میتوکندریایی و ژن‌های تنظیم کننده موثر در فرآیند تکامل اووسیت پرداخته شده است. به این منظور از شبکه ژنی استفاده گردید. علاوه بر این، مهم‌ترین مسیرهای بیولوژیکی به منظور درک سازوکار اثر هورمون مزبور بر روند بلوغ اووسیت از طریق اندامک میتوکندری بررسی گردید.

مواد و روش ها

پیاده‌سازی داده‌ها

در این مطالعه به منظور بررسی اثر هورمون FSH بر چگونگی بیان ژن‌های میتوکندریایی، کدهای دسترسی GEO برای این مجموعه داده‌ها GSE38345 از پایگاه داده NCBI به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query acc.cgi?acc=GSE38345 پیاده‌سازی گردید. این داده‌ها حاوی اطلاعات بیان ژن سلول‌های اووسیت گاو می‌باشد که در شرایط آزمایشگاهی تحت تأثیر هورمون FSH و با استفاده از تکنیک ریزآرایه بدست آمده‌اند (۲۰).

آنالیز داده‌ها و شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده

پس از پیاده‌سازی داده‌ها کیفیت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به اینکه نرم افزار برای نرمال‌سازی داده‌ها بر روی گزینه خودکار بود، نرمال‌سازی داده‌ها در صورت تشخیص توسط نرم‌افزار انجام شد. آنالیز داده‌ها و مقایسه بیان ژن‌ها در دو حالت قبل از بلوغ (۲۰ ساعت بعد از تیمار اووسیت با هورمون FSH در شرایط آزمایشگاهی) و بعد از بلوغ (۹۶ ساعت بعد از تیمار اووسیت با هورمون FSH در شرایط آزمایشگاهی) با استفاده از لینک نرم‌افزاری GEO2R انجام شد.

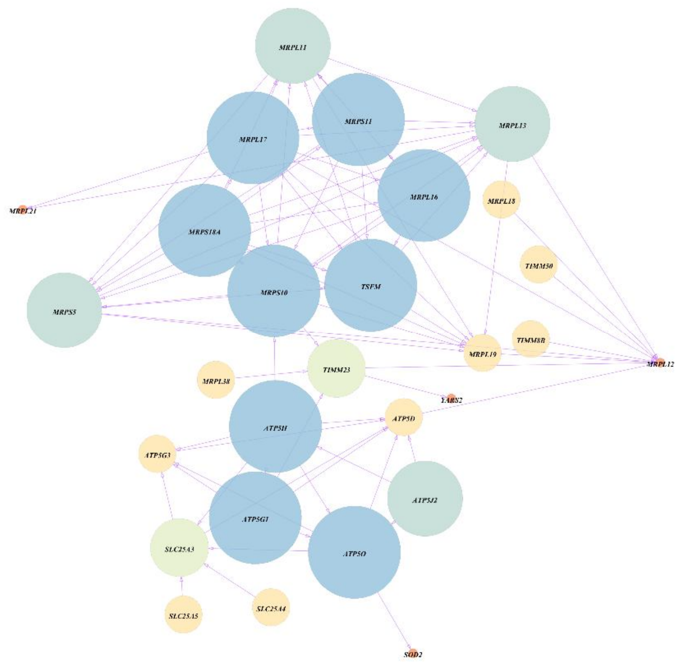
شبکه‌ها و هستی‌شناسی ژن‌های میتوکندری

بعد از آنالیز کل ترانسکریپتوم، ژن‌های میتوکندری بر اساس annotation فایل مربوط به داده‌ها جدا شدند و دو دسته ژنی شامل ژن‌های افزایش و کاهش بیان داشته تشکیل شد. برهمکنش هر یک از گروه‌های ژنی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی string به آدرس https://string-db.org/ بر اساس اطلاعات هم‌بیانی، مورد بررسی قرار گرفت. مجسم‌سازی شبکه با استفاده از نرم‌افزار cytoscape(3.6.0) انجام گردید. هستی‌شناسی مسیرهای ژنی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی comparative GO انجام ‘گردید.

نتایج و بحث

در مقایسه‌ای که بین داده‌های بیان ژن اووسیت در مرحله قبل از بلوغ با مرحله بعد از بلوغ در اثر تیمار با هورمون FSH انجام شد، مشخص گردید ۱۰۰ ژن افزایش بیان و ۹۴ ژن کاهش بیان داشتند. این ژن‌ها یا در میتوکندری ساخته شده و یا اینکه در هسته ساخته شده و در میتوکندری عملکرد خود را نشان دادند. از این میان با بررسی شبکه برهمکنش پروتئینی در مجموعه ژن‌های افزایش بیان و کاهش بیان داشته مشخص گردید از میان ۱۰۰ ژنی که افزایش بیان داشته‌اند، ۶۸ ژن بر اساس اطلاعات string هم‌بیان هستند. در میان ژن‌های کاهش بیان داشته نیز ۵۳ ژن از میان ۶۴ ژن هم‌بیان گزارش شده بودند. شبکه برهمکنش ژنی در مجموعه ژن‌هایی که در اثر فرآیند تکامل اووسیت در اثر هورمون FSH افزایش بیان داشته‌اند در تصویر ۱ و آنالیز ژن‌های آن در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱ حاوی برخی فراسنجه‌های ژنی میتوکندریایی مربوط به آنالیز شبکه برهمکنش ژن‌های افزایش بیان یافته در طی بلوغ اووسیت است. ژن‌های تنظیم کننده مهم در جدول بر اساس تعداد کمان‌های خروجی و در شکل بر اساس اندازه دایره‌ها انتخاب گردیدند. اندازه گره (گره‌های بزرگتر اثرات تنظیم کنندگی بیشتر به کمتر) و تغییر رنگ از آبی پررنگ به سمت نارنجی نشان دهنده اثرات تنظیم کنندگی بیشتر به کمتر می‌باشد. بر این اساس دو خانواده ژنی MRPS و MRPL به عنوان مهم‌ترین خانواده ژنی تأثیرگذار بر بلوغ اووسیت در اثر تیمار با هورمون FSH معرفی گردیدند. ژن‌های MRPS10، MRPS18A و MRPS11 از مهم‌ترین اعضای خانواده MRPS در شبکه مزبور هستند. علاوه بر این ژن‌های MRPL12، MRPL13، MRPL16، MRPL17 و MRPL21 از اعضای خانواده ژنی MRPL بوده و اثر آن‌ها در بلوغ اووسیت در شرایط آزمایشگاهی تحت تیمار مزبور، مهم شناسایی شده است.



شکل ۱- شبکه برهمکنشی پروتئینی ژن‌های تنظیمی افزایش بیان یافته میتوکندری

Figure 1- PPI network of up regulated mitochondrial genes

جدول ۱– آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین ژن‌های تنظیمی افزایش بیان یافته میتوکندری

Table 1- PPI network analysis of significant up regulated mitochondrial genes

Name نام ژن	EdgeCount مجموع کمان‌ها برای هر گره	Indegree کمان‌های ورودی	Outdegree کمان‌های خروجی	Stress
MRPS10	11	6	5	26
MRPL13	11	8	3	17
MRPL17	11	1	10	2
MRPS18A	9	0	9	0
MRPL12	9	9	0	0
MRPL19	8	7	1	4
MRPS11	8	3	5	0
MRPL16	8	2	6	0
MRPL21	2	2	0	0

MRPS10 یکی از ژن‌های مهم در این شبکه است که پـروتئین زیر واحد S ۲۸ که متعلق به خانواده پروتئین‌هـای ریبـوزومی PS10 می‌باشد را رمزگذاری مـی‌کنـد و نقـش مهمـی در ترجمـه ژن‌هـای میتوکندری دارد. ضعف ترجمه در میتوکندری باعث کـاهش فعالیـت این اندامک می‌شود. این ژن علاوه بر فرایند ترجمه پـروتئین، نقـش مهمی در انهدام میتوکندری ایفا می‌کند. با توجه به ضرورت حضور و فعالیت میتوکندری‌ها جهت تولید انرژی برای اووسیت، لازم است که از طریق کنترل کیفیت، عملکرد خوب میتوکندری حفـظ شـود (۳۷). همانطور که میتوکندری‌ها ATP تولیـد مـی‌کننـد، آن‌هـا هـم‌چنـین اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) را آزاد می‌کنند که باید سم‌زدایی شـوند زیرا می‌توانند باعث آسیب اکسیداتیو بـه DNA میتوکنـدری شـوند. اخیراً اهمیت انهدام میتوکندری مشخص شده‌است، زیـرا آسـیب‌هـای موجود در میتوکندری ممکن است منجر به تعداد زیادی ناهنجـاری‌-های سلولی شود. فرآیند حذف میتوکندری ناکارآمد مـی‌توانـد بـا دو مسیر اصلی، انهدام میتوکندری ناشی از آسیب و ناشی از رشد ایجـاد شود (۳۰). انهدام میتوکندری نه تنهـا میتوکنـدری‌هـای ناکارآمـد را پاکسازی می‌کند، بلکه در پاسخ به محرومیت مواد مغذی و هیپوکسی موجب کاهش حجم کلی میتوکندری می‌شود (۳۷). انهدام میتوکندری ناشی از آسیب موجب حذف میتوکندری آسیب‌دیده یا ناقص می‌شود. افزایش بیان ژن مزبور در مطالعه حاضر، می‌توانـد دلیلـی بـر حیـاتی بودن این ژن در تولید و ایجاد میتوکندری‌های سالم در اووسیت باشد.

یکی از ژن‌های مهم دیگـر کـه در شـبکه بـرهمکنش ژن‌هـای افزایش بیان داشته در فرآینـد بلـوغ اووسـیت مطـرح مـی‌باشـد، ژن MRPS18A است. پروتئین این ژن در ترجمه ژن‌های میتوکندری و

اثر بر عملکرد این اندامک (تولید انرژی) دخیل است. افزایش بیان این ژن در هنگام بلوغ اووسیت می‌تواند به دلیل نیاز اووسیت به مقادیر زیاد ATP در هنگام بلوغ به دنبال افزایش تقاضای سلولی که در پی آن ژنوم هسته‌ای پروتئین‌های ریبوزومی مورد نیاز میتوکندری را تولید می‌کند تا به میتوکندری وارد شوند و تکثیر mtDNA و گسترش شبکه میتوکندری را آغاز کنند، توجیه گردد. ریبوزوم‌های میتوکندری در ماتریکس میتوکندری حضور دارند. مشخص گردیده که ریبوزوم‌های میتوکندری در پستانداران شامل یک زیر واحد بزرگ s ۳۹ و یک زیر واحد کوچکتر s ۲۸ می‌باشد. ژن MRPS18A پروتئین مربوط به زیر واحد S ۲۸ که متعلق به خانواده پروتئین‌های ریبوزومی است، پروتئین P18s را رمزگذاری می‌کند. مشخص گردیده، تخمک‌های با کیفیت خوب حاوی مقادیر مطلوب میتوکندری و سطوح کافی ATP بوده و در نتیجه توانایی تولید بلاستوسیت‌های با کیفیت بالاتر را بعد از باروری دارند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در بلوغ اووسیت این ژن می‌تواند به عنوان نشانگر [1] مهمی در رابطه با تولید انرژی باشد (۵).

ژن MRPL16 یکی دیگر از ژن‌های میتوکندریایی می‌باشد که در شبکه برهمکنش پروتئینی در رابطه با ژن‌های افزایش بیان داشته، در این مطالعه، مهم شناسایی گردید. این ژن یک پروتئین زیر واحد S ۳۹ را رمزگذاری می‌نماید و نقش مهمی در ترجمه ژن‌های میتوکندری و تولید انرژی دارد. افزایش تعداد میتوکندری در اطراف هسته، در هنگام بلوغ تخمک نشان داده شده است (۴۴). شرایط نامناسب می‌تواند حرکت میتوکندری را به داخل سیتوپلاسم متوقف کند و بنابراین بر بلوغ سیتوپلاسمی تخمک تأثیر گذارد (۴۲). همچنین گزارش شده است که توزیع غیرطبیعی میتوکندری‌ها مربوط به تشکیل نامناسب شبکه میتوکندری سیتوپلاسمیک است که موجب توقف بلوغ تخمک می‌گردد. مشخص گردیده یکی از پر انرژی‌ترین فعالیت‌ها درون تخمک در هنگام بلوغ، جمع‌آوری و جداسازی میکروتوبول‌ها است که نقش مهمی در جداسازی کروموزوم‌ها دارد. همچنین آغاز مرحله متافاز در تخمک بستگی به حرکت و جداسازی میکروتوبول‌ها دارد. تأمین انرژی جهت انجام درست این حرکت و ایجاد توزیع مناسبی از میتوکندری‌ها مهم می‌باشد نتایج این مطالعه به همراه مطالعات گزارش شده بر نقش مهم ژن MRPL16 در بلوغ اووسیت از طریق اثر بر چگونگی توزیع این اندامک، اشاره دارد (۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن مهم دیگر در شبکه برهمکنش پروتئینی مربوط به ژن‌های افزایش بیان یافته، MRPL17 است. این ژن یک پروتئین زیر واحد ریبوزومی را رمزگذاری می‌نماید و نقش مهمی در ترجمه ژن‌های میتوکندری دارد (۱۷). در طی رشد فولیکول وضعیت عملکرد میتوکندری‌ها به کیفیت تخمک‌ها کمک می‌کند و احتمالاً نقش مهمی در روند لقاح و رشد جنین دارد. بنابراین، عدم موفقیت تخمدان با محتوای پایین mtDNA همراه است، که احتمالاً به دلیل وجود میتوکندری غیرطبیعی و بیان پایین ژن‌های مرتبط به ساخت پروتئین‌ها در این اندامک در طول رشد تخمک و در نهایت عدم بلوغ سیتوپلاسمی می‌باشد (۹). اولین میوز در تخمک نیاز به بیشترین میزان انرژی درون اووسیت برای تشکیل رشته‌های دوک دارد که در جداسازی مناسب کروموزوم ضروری‌اند. لقاح میوز II را کامل می‌کند و نیاز به افزایش مقدار ATP دارد. ضعف در تولید میتوکندری و به دنبال آن کاهش تولید ATP و ایجاد خطاهای تقسیم میوز می‌تواند منجر به عدم نفوذ اولین جسم قطبی، توزیع نامنظم کروموزوم و آنوپلوئیدی شود. یافته‌های مشابه برای موش گزارش شده است (۴۱). یکی دیگر از وظایف میتوکندری که به تولید انرژی کمک می‌نماید افزایش میزان کلسیم آزاد سیتوپلاسمی است که برای بلوغ اووسیت و رشد جنین پس از لقاح ضروری است. در واقع افزایش کلسیم در سلول موجب بیان آنزیم‌های زنجیره‌ای تنفسی می شود که تولید ATP را از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو افزایش می‌دهد (۴۶). بر اساس نتایج این مطالعه ژن MRPL17 می‌تواند به عنوان نشانگر مهمی در رابطه با تولید انرژی معرفی گردد.

نتایج هستی‌شناسی شبکه برهمکنش پروتئینی مربوط به ژن‌های افزایش بیان یافته میتوکندریایی در جدول ۲ آمده است. بر اساس این نتایج، مسیرهای بیولوژیکی انتشار سیتوکروم C، مرگ سلولی، انهدام میتوکندری [2]، پروسه تولید ATP و پروتئین، بر اساس p-value معنی‌دار، مهم معرفی گردیدند.

مسیرهای بیولوژیکی انتشار سیتوکروم C، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، انهدام میتوکندری در حذف میتوکندری‌های آسیب‌دیده ضروری می‌باشند. حین فرآیند بلوغ اووسیت و نیاز مبرم سلول به انرژی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در میتوکندری اتفاق می‌افتد که منجر به ایجاد جهش وابسته به آسیب اکسایشی می‌گردد. همچنین جهش‌های ژنوم میتوکندری می‌توانند بر اجزاء زنجیره تنفس مانند سیتوکروم‌ها تأثیر سوء بگذارند و آن‌ها را از زنجیره تنفسی جدا کند و در نتیجه باعث افزایش نشت الکترون و تولید مفرط ROS شوند. این جهش‌ها در انواع مختلف سرطان نیز یافت می‌شوند. میتوکندری‌های پیر یا آسیب‌دیده سطوح بالای ROS تولید می‌کنند اما معمولاً از طریق انهدام میتوکندری از بین می‌روند. انهدام میتوکندری یک نمونه تخصصی از فرایند از بین بردن است که این اندامک‌ها بطور گزینشی برای دفع با وساطت لیزوزوم مورد هدف قرار می‌گیرد. میتوکندری‌ها با رهایی مولکول‌های فعال کننده مکانیسم خودکشی سلولی به طور مستقیم و غیر مستقیم در این فرایند شرکت

1- Marker

2- Mitophagy

می‌کنند. به طور مثال برخی از انکوپروتئین‌ها مثل محصولات ژن‌های مهار کننده تومور، عوامل عفونت‌زایی و ویروسی و دارویی می‌توانند از طریق مستقیم بر روی میتوکندری مرگ سلولی را فعال نمایند (۳۹). آبشار کاسپازی با رهایی سیتوکروم C از میتوکندری کامل مـی‌شـود، مولکول‌های خانواده Bcl-2 ایـن مرحلـه را کنتـرل مـی‌کننـد. سـایر اعضای این خانواده فعالیت Bak و Bax را القا می‌کنند و سبب القای نفوذپذیری غشای میتوکندریایی و انتشار سیتو کروم C می‌شوند.

جدول۲- هستی شناسی ژن‌های تنظیمی افزایش بیان یافته میتوکندری در شبکه برهمکنش پروتئینی

Table 2- Gene ontology of significant up regulated mitochondrial genes in the PPI network

GO ID شناسه هستی شناسی	GO Name شرح هستی شناسی	p-value سطح معنی داری
70126	mitochondrial translational termination	0
70125	mitochondrial translational elongation	0
70124	mitochondrial translational initiation	0
32543	mitochondrial translation	0
42776	mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	1.159006E-11
22904	respiratory electron transport chain	6.375143E-7
44237	cellular metabolic process	2.472852E-5
2	mitochondrial genome maintenance	5.276424E-5
6412	translation	1.13846E-3
30150	protein import into mitochondrial matrix	1.258119E-3
6754	ATP biosynthetic process	1.299596E-3
6626	protein targeting to mitochondrion	2.245551E-2
1836	release of cytochrome c from mitochondria	8.992552E-3
15992	proton transport	2.245551E-2
6091	energy generation of precursor metabolites and	3.208869E-2
15991	ATP hydrolysis coupled proton transport	4.009986E-2

در سلول‌های سـالم، سـیتوکروم C در فضـاهـای میـان غشـاء (کریستا) میتوکندری قرار دارد، جایی که به عنوان شاتل الکترونی در زنجیره تنفسی عمل می‌کند و بـا کـاردیولیپین (CL) تعامـل برقـرار می‌نماید. چندین محرک مرگ سلولی، نفوذ پذیری غشـاء خـارجی را ایجاد می‌کنند، ارتباط فضاهای میان غشا را تسهیل می‌کنند و باعث انتشـار و آزاد شـدن سـیتوکروم C از CL مـی‌شـود. در سـیتوزول، سیتوکرومC از طریق فعال شدن آلوستریک عامل ۱ آپوپتوز–پروتئـاز فعال می‌شود که برای بلوغ پروتئولیتیک کاسپاز ۳ و کاسـپاز ۹ مـورد نیاز است. سیتوکروم C بدون شک یکـی از عوامـل مهـم در صـحنه مرگ سلولی است. اگرچه معمـولاً عملکـرد اصـلی آن روی زنجیـره تنفسی است، اما زمانی که میتوکندری آسیب‌دیده است یا زمانی کـه دستورالعمل‌هایی برای شکستن غشای خارجی دریافت می‌کند، انتشار می‌یابد. هنگامی که از چارچوب معمول خود بیرون رانده می‌شود، بـه تخریب سلولی کمک می‌کند. نشان داده شده است در موش، به دلیل اختلال در ژن کدکننده سیتوکروم C منجر به مرگ جنینی مـی‌شـود (۲۴).

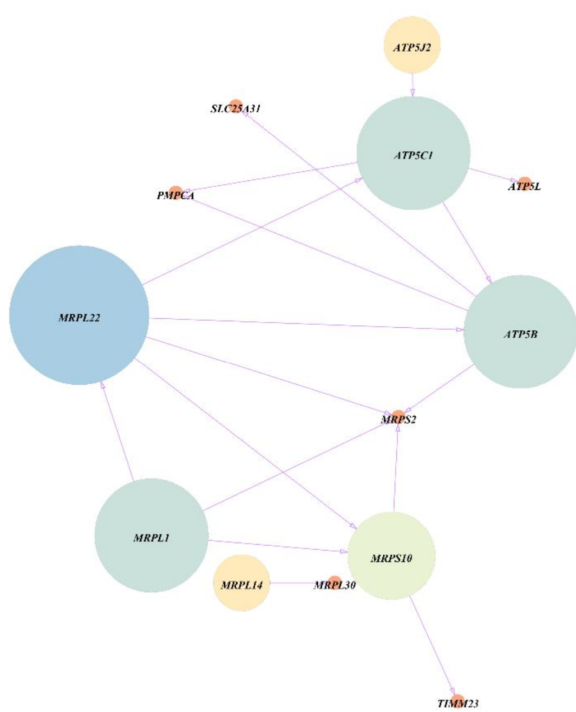
همانطور که در هستی‌شناسی مسیرهای ژنی در جدول ۲ نشـان داده شده است، ژن‌های که در فراینـد بلـوغ اووسیـت افـزایش بیـان یافتند در پروسه تولید ATP نیز نقش دارند. به دلیل عملکرد گسترده میتوکندری در تولید ATP از طریـق فسفوریلاسـیون اکسـیداتیو، در طیف گسترده‌ای از عملکرد سلولی مانند اکسیداسیون اسیدهای چرب، بیوسنتز اسید آمینه، آپوپتوز، بقای سلول و انتقال سیگنال‌های سلولی نقش اساسی دارد. میتوکندری‌ها بـه طـور یکنواخـت در سیتوپلاسـم پراکنده‌اند با وجود این در برخی حالات، در جاهایی نیازمند به انرژی فراوان مستقر می‌شوند. همچنین هرچه مصرف انرژی سـلول بیشـتر باشد، اندازه میتوکندری‌ها بزرگ‌تر و تعداد آن ها بیشتر خواهد بـود و برعکس (۸). در واقع این دسته از ژن‌های افزایش بیان یافته در ایـن مطالعه در سلول موجب افزایش بیان آنـزیم‌هـای زنجیـره‌ی تنفسـی می‌شود که تولید ATP را افزایش می‌دهد. تولید ATP در میتوکندری توسـط فراینـدهـای چرخـه تـری کربوکسـیلیک اسـید (TCA) در ماتریکس میتوکندری و زنجیره انتقال الکترون واقع در غشای داخلی صورت می گیرد. میتوکندری به واسـطه چنـدین واکـنش شـیمیایی انرژی تولید می‌کند. در نتیجه‌ی این واکنش‌های شیمیایی الکترون در طول یک غشا منتقل می‌شود. زنجیره انتقال الکترون مجموعـه‌ای از کمپلکس‌های پروتئینی است که در غشای درونی میتوکندری با هـم ترکیب می‌شوند. این کمپلکس‌ها شامل کمپلکس I تنفسی (NADH دهیدروژناز)، کمپلکس II (سوکسـینات دهیـدروژناز)، کمـپلکس III (کمـپلکس سـیتوکروم) و کمـپلکس IV (سـیتوکروم C اکسـیداز) می‌باشند. این فرایند باعث ایجاد یک شیب الکتروشیمیایی مـی‌گـردد که بخش الکتریکی یا شیب ناشی از پروتون بوسیله اخـتلاف بـار در

غشای داخلی میتوکندری ($\Delta\psi m$) و یک بخش شیمیایی از اختلاف در غلظت یون‌ها در هر دو طرف غشا رخ مـی‌دهـد (ΔpHm). ایـن شیب الکتروشیمیایی منجر بـه تولیـد ATP از ADP و Pi در فراینـد بلوغ اووسیت، توسط آنزیم نهایی زنجیـره انتقـال الکتـرون، F1Fo-ATPسنتاز، و یا کمپلکس V می‌شود (۲۷).

با توجه به نتایج هستی‌شناسی مسیرهای ژنی مشـخص گردیـد، ژن‌هایی که افزایش بیان داشته‌انـد، در پروسـه تولیـد پـروتئین‌هـای (رونویسی، ترجمـه، انتقـال پـروتئین و ...) مهـم میتوکنـدری نقـش داشته‌اند. مشخص گردیده ژنوم میتوکندری یک DNA دو طرفه است که تقریبا ۱۶٫۷ کیلو بایت است، DNA میتوکندری انسان حاوی هیچ منطقه بدون رمز نیست. ژنوم میتوکندری مسـتقل از چرخـه سـلولی تکرار مـی‌شـود. ایـن DNA آنـزیم‌هـایی را کـه در فسفوریلاسـیون اکسیداتیو دخیل هستند، کپی مـی‌کنـد. ژنـوم میتوکنـدری تنهـا ۱۳ پروتئین زیر واحد مسیر فسفوریلاسیون اکسیداتیو، ۲۲ RNA ناقـل و ۲ RNA ریبوزومی را کدگذاری می‌کند (۳۶). ۷۴ پلی پپتید دیگـر از کمپلکس فسفریلاسیون اکسیداتیو توسط ژنوم هسته‌ای رمز می‌گردند، از طرفی اگرچه میتوکندری دارای سیستم کامل ترجمه در مـاتریکس است، اما تنها حدود ۱ درصد از تمام پروتئین‌های میتوکندری توسـط ژنوم میتوکندری رمزگشایی می‌شوند. اکثر پـروتئین‌هـای ریبـوزومی میتوکندری پستانداران توسط ژن‌های هسته‌ای کدگذاری می‌شـوند و این‌ها به عنوان پروتئین پیش‌ساز در سیتوزول سنتز می‌شوند و به طور عمده توسط مکانیزم پس از ترجمه به میتوکندری انتقال می‌یابند و به ترجمه پروتئین در میتوکندری کمک می‌کنند (۱۰). با توجه به نقـش میتوکندری در تولید انرژی در فرآیند تکامل اووسیت منطقی به نظـر می‌رسد تا مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با سنتز پروتئین‌ها (آنزیم های زنجیره تنفسی) در این اندامک فعال باشد.

شبکه برهمکنش ژنی در مجموعه ژن‌هـایی کـه در اثـر فرآینـد تکامل اووسیت تحت تاثیر هورمون FSH کاهش بیان داشـته‌انـد در تصویر ۲ و آنالیز ژن‌های آن در جدول ۳ آورده شده است.

مهم‌ترین ژن در شبکه برهمکنش پروتئینی مربوط بـه ژن‌هـای کـاهش بیـان یافتـه، ژن MRPL22 مـی‌باشـد. ایـن ژن یکـی از پروتئین‌های ریبوزومی را کـد مـی‌کنـد. در واقـع میتوکنـدری دارای سیستم ترجمه برای تولید ۱۳ زیر واحد ضروری برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو است. MRPL22. یکی از بـیش از ۷۰ مولکـول پروتئینـی ریبوزوم‌های میتوکندری است که توسط ژنـوم هسـته‌ای کـدگـذاری می‌شوند (۱۸). نیکلاس و همکاران به ایـن نتیجـه رسـیدند کـه ژن MRPL22 تاثیر معنی‌داری در تخمک‌گذاری و تشکیل جنـین نـدارد (۲۶).



شکل ۲- شبکه برهمکنشی پروتئینی ژن‌های تنظیمی کاهش بیان یافته میتوکندری

Figure 2- PPI network of down regulated mitochondrial genes

جدول ۳- آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین ژن‌های تنظیمی کاهش بیان یافته میتوکندری
Table 3- PPI network analysis of significant down regulated mitochondrial genes.

name نام ژن	EdgeCount مجموع کمان‌ها برای هر گره	Indegree کمان‌های ورودی	Outdegree کمان‌های خروجی	Stress
ATP5C1	5	2	3	9
ATP5B	5	2	3	8
MRPL22	5	1	4	6

همچنین گزارش شده است که این ژن در برخی بیماری‌ها مانند آلزایمر کاهش بیان داشته است و این کاهش بیان با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی همراه است. کاهش بیان این ژن در نهایت به انهدام میتوکندری می‌انجامد (۲۳). ازآنجایی که عملکرد ناصحیح میتوکندری به عنوان اندامکی که در متابولیسم انرژی نقش بسیار مهمی دارد می‌تواند به شرایط پاتولوژیک منجر شود و بیماری‌های میتوکندریایی به طور موثر در اثر اختلالات در زنجیره حمل و نقل الکترون و عدم تعادل بین تقسیم و ازدیاد میتوکندری ناشی می‌گردند. همچنین استرس اکسیداتیو ناشی از تداوم جریان الکترون‌ها از NADH در چرخه تولید انرژی سبب افزایش تولید ROS و آسیب میتوکندری‌ها توسط ROS می‌باشد (۱). بنابراین ژن MRPL22 از طریق کاهش بیان خود باعث کاهش تولید پروتئین‌های ریبوزومی میتوکندری و به دنبال آن کاهش تولید ATP در میتوکندری، باعث برقراری تعادل در ایجاد انرژی در چرخه فسفوریلاسیون اکسیداتیو و کاهش آسیب به میتوکندری می‌گردد. از طرفی این ژن با کاهش بیان خود مانع از آسیب دیدن میتوکندری با کیفیت بالا می‌گردد.

در این پژوهش یکی از ژن‌های مهم در شبکه برهمکنش پروتئینی بلوغ اووسیت در مجموعه ژن‌هایی که طی بلوغ اووسیت کاهش بیان یافته‌اند، ژن ATP5B است. ژن مزبور یک زیر واحد از ATP سنتتاز را رمزگذاری می‌کند. ATP سنتتاز متشکل از دو مجموعه چند واحدی شامل هسته کاتالیزوری، F1 و اجزای غشایی، F0 و کانال پروتون است. کانال پروتون شامل سه زیر واحد اصلی(a، b، c) می‌باشد. این ژن، زیر واحد بتا را در هسته کاتالیزوری رمز-گذاری می‌کند و در تشکیل ATP با کمک شارش پروتون در غشای داخلی میتوکندری در طول فسفوریلاسیون اکسیداتیو نقش دارد. ساختار و عملکرد ATP5B که جزء اصلی مرکز کاتالیزوری کمپلکس ATP سنتتاز است، نقش مهمی در تعادل در فرایند تولید ATP توسط اندامک میتوکندری ایفا می‌نماید (۳۱). با توجه به اهمیت زیاد میتوکندری در فرآیند بلوغ اووسیت و ضرورت تعادل فرآیندهای فسفوریلاسیون مرتبط با این اندامک، نتایج این مطالعه مبنی بر آن است که ژن ATP5B به عنوان ژن کلیدی در فرآیند مزبور با کاهش بیان خود باعث برقراری تعادل و تنظیم میزان ATP مربوط می‌شود و به عنوان یک نشانگر تعادلی در تنظیم میزان ATP معرفی می‌گردد.

ژن مهم دیگر در شبکه ژن‌های کاهشی بلوغ اووسیت ATP5C1 است. این ژن یک زیر واحد از ATP سنتتاز میتوکندری را رمزگذاری می‌کند. ATP سنتتاز میتوکندری، سنتز ATP را با استفاده از یک شیب الکتروشیمیایی پروتون در سراسر غشای داخلی در طول فسفوریلاسیون اکسیداتیو بر عهده دارد. بخش کاتالیستی ATP سنتتاز میتوکندری متشکل از ۵ زیر واحد (آلفا، بتا، گاما، دلتا و اپسیلون) می‌باشد. این ژن، زیر مجموعه گاما هسته کاتالیزوری را رمزگذاری می‌کند. تنظیم زیر واحد اپسیلون تحت نظارت زیر مجموعه گاما و احتمالاً با حضور ADP تعیین می‌شود. به نظر می‌رسد که گسترش زیر واحد اپسیلون در حضور ADP صورت پذیرد، در نتیجه به عنوان یک قفل ایمن برای جلوگیری از هیدرولیز و اتلاف ATP عمل می‌کند (۱۱). در مطالعه‌ای، فسفریلاسیون مسیر مهم و معنی-دار در سلول‌های کومولوس نشان داده شده است. در این مطالعه مشخص گردیده که ژن‌های ATP5C1 و ATP5B در سلول‌های کومولوس نسبت به وزیکول ژرمینال بیان بیشتری دارند (۳۳). با توجه به کاهش بیان ژن ATP5C1 در پروسه بلوغ اووسیت و نقش این ژن در ایجاد تعادل در عملکرد ATP سنتتاز می‌توان این ژن را به عنوان نشانگر کنترلی در این فرآیند پیشنهاد داد.

در جدول ۴ نتایج هستی شناسی شبکه برهمکنش ژن‌های کاهش بیان داشته میتوکندریایی نشان داده شده است. از مهم‌ترین مسیرهای بیولوژیکی که ژن‌های مربوط به این مسیرها کاهش بیان یافته‌اند، مسیرهای ژنوفاژی[1]، انهدام میتوکندری است. ژنوفاژی یک مکانیزم اتوفاژیک محافظت شده است که به طور خاص پاتوژن‌ها و دیگر نهادهای غیر میزبان را مورد هدف قرار می‌دهند. ژنوفاژی که به دنبال حمله و تخریب پاتوژن‌ها پس از حمله پاتوژن‌ها به سلول میزبان صورت می‌گیرد (۴۵ و ۱۵). پاتوژن‌ها می‌توانند از طریق فاگوسیتوز به سلول وارد شوند (۷). لیزوزوم‌ها منجر به تخریب کامل پاتوژن از طریق سیگنال‌های خارج سلولی می‌شوند (۲۱).

1- Xenophagy

جدول ٤- هستی شناسی ژن‌های تنظیمی کاهش بیان یافته میتوکندری در شبکه برهمکنش پروتئینی

Table 4- Gene ontology of significant down regulated mitochondrial genes in the PPI network

GO ID شناسه هستی شناسی	GO Name شرح هستی شناسی	p-value سطح معنی داری
42776	mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	9.821455E-10
32543	mitochondrial translation	3.395928E-9
70124	mitochondrial translational initiation	5.672348E-8
70125	mitochondrial translational elongation	6.031949E-8
70126	mitochondrial translational termination	7.056072E-8
6754	ATP biosynthetic process	1.178857E-5
98792	xenophagy	2.54895E-2
98779	mitophagy in response to mitochondrial depolarization	6.107588E-2
6996	organelle organization	1.173506E-5

در تخم‌های بارور شده، اندوسیتوز و اتوفاژی[1] بـه شـدت فعـال می‌شوند. نشان داده شده است که در جنین‌های موش، تعداد و فعالیت لیزوزوم‌ها پس از بارور شدن به طور قابل توجهی افزایش مـی‌یابـد و مهار فعالیت لیزوزوم منجر به توقـف رشـد در جنـین مـی‌شـود. اتـو فاگوزوم به طور مستقیم در اطراف ارگانیسـم‌هـای حاصـل از اسـپرم تشکیل شده است، که باعث اتوفاژی انتخـابی پـاتوژن(ژنوفـاژی) و اتوفاژی میتوکندری (انهدام میتوکنـدری) در سـلول‌هـای سـوماتیک است. در هر دو مسیر، سیگنال ubiquitination تشخیص داده شـده است (۶). بنابراین، افزایش فعالیت لیزوزومی پس از لقاح، بـه عنـوان یک فرآیند حفاظت شده و ضروری بـرای توسـعه جنـین اسـت. ایـن فرایند بعد از بلوغ اووسیت پس از لقاح صورت می‌گیرد، بدیهی اسـت که این ژن‌ها در زمان بلوغ اووسیت کاهش بیان داشته‌انـد، بـه نظـر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

از آن جایی که میتوکندری اندامک تأمین کننـده انـرژی سـلول است که برای زنده ماندن و نمو ضـروری اسـت، بنـابراین موقعیـت مکانی و عملکرد آن روی کیفیت تخمک مؤثر است و به دنبال آن در فرایند لقاح و تکوین جنینی دخالـت مـی‌کنـد. بـا توجـه بـه اهمیـت میتوکندری در تکوین تخمک و گزارش‌های محدود و متنـاقض کـه درگونه‌های مختلف پستانداران وجود دارد، در این مطالعه به شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مهم میتوکندری در بلوغ اووسیت نیز پرداخته شـد. در اندامک میتوکندری فراینـدهـای حـذف و گسـترش جهـت بقـای میتوکندری‌ها و ایجاد تعادل در بسیاری از پارامترهای حیاتی سـلولی مانند تولید انرژی، وضعیت اکسیداسیون / احیا، تولید گونـه اکسـیژن فعال، کنترل سطح کلسیم سیتوپلاسم، شروع آپوپتوز از طریق فعال-سازی نفوذپذیری منافذی در میتوکندری، در جریان اسـت. تغییـر در این پارامترها می‌تواند منجر به اختلال در مسیرهای انتقـال سـیگنال سلولی، عوامل رونویسی و ساختار کروماتین شود که در نهایت باعث اختلال در نظم فعالیت‌های سلول‌ها می‌گردد. در زمان بلوغ اووسـیت جایی که نیاز به فعالیت میتوکندری برای تولیـد ATP باشـد، شـبکه میتوکندری سعی در گسترش خود دارد، اما گـاهی افـزایش عملکـرد میتوکندری‌ها باعث تولید اکسیژن واکنش‌پذیر گونـه اکسـیژن فعـال می‌گردد که باید سم‌زدایی شوند، زیرا می‌توانند باعث آسیب اکسیداتیو به ژنوم میتوکندری گردند، در این زمان فرایند حذف فعال می‌شود.

در این مطالعه دو خـانواده ژنـی MRPS و MRPL بـه عنـوان مهم‌ترین خانواده ژنی تأثیرگذار میتوکندری که در زمان بلوغ اووسیت در اثر تیمار با هورمون FSH افزایش بیان یافتـه‌انـد مشـخص شـد. MRPS10 یکی از ژن‌های مهم در این شبکه نقش مهمی در ترجمه ژن‌های و انهدام میتوکندری ایفا می‌کند. انهدام میتوکندری ناشـی از آسیب، موجب حذف میتوکندری آسیب‌دیده یا ناقص می‌شود. حضور و افزایش بیان ژن مزبور در مطالعه حاضر، می‌توانـد دلیلـی بـر حیـاتی بودن این ژن در تولید و ایجاد میتوکندری‌های سالم در اووسیت باشد. پروتئین ژن MRPS18A در ترجمه ژن‌هـای میتوکنـدری و اثـر بـر عملکرد این اندامک (تولیـد انـرژی) دخیـل اسـت. اهمیـت ATP در کیفیت مطلوب تخمک در بلوغ مشخص شده است. بنابراین در بلـوغ اووسیت این ژن می‌تواند به عنوان نشانگر مهمی در رابطه بـا تولیـد انرژی باشد. ژن MRPL16 که در تأمین انرژی لازم جهت تشکیل و جداسازی میکروتوبول و ایجاد توزیع مناسبی از میتوکنـدری‌هـا مهـم می‌باشد. نتایج این مطالعه به همراه مطالعات گزارش شده بـر نقـش مهم ژن MRPL16 در بلوغ اووسیت از طریق اثر بر چگونگی توزیـع این اندامک، اشاره دارد. ژن MRPL17 به دلیل نقش در ترجمه ژن-های میتوکندری می‌تواند به عنوان نشانگر مهمی در رابطه بـا تولیـد انرژی معرفی گردد.

در شبکه ژن‌های کاهش بیان یافته میتوکنـدری ژن MRPL22 از طریق کاهش بیان خود باعث کاهش تولید پروتئین‌های ریبوزومی

1- Autophagy

میتوکندری و به دنبال آن کاهش تولید ATP در میتوکندری، باعث برقراری تعادل در ایجاد انرژی در چرخه فسفوریلاسیون اکسیداتیو و کاهش آسیب به میتوکندری می‌گردد. از طرفی این ژن با کاهش بیان خود مانع از آسیب دیدن میتوکندری با کیفیت بالا می‌گردد. در واقع کاهش بیان این ژن با القای انهدام سلولی ممکن است برای حفظ کیفیت تخمک در مواجه با استرس‌های محیطی در هنگام بلوغ در شرایط آزمایشگاهی قابل توجیه باشد.کاهش بیان دو ژن ATP5B وATP5C1 با توجه به نقش کلیدی این ژن‌ها در ساختار ATP سنتتاز، در جهت تعادل در ساخت ATP در میتوکندری می باشد و به عنوان نشانگر تعادلی شناسایی شدند. در این مطالعه هر دو گروه از ژن‌ها از طریق افزایش و کاهش بیان خود، سعی در ایجاد تعادل در مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با فرایندهای انهدام سلولی، تولید پروتئین‌های ریبوزومی میتوکندری، تولید ATP دارند و می‌توانند به عنوان مسیرهای تنظیمی مهم برای رسیدن به کیفیت مطلوب اووسیت و تشخیص زمان تکمیل بلوغ در محیط آزمایشگاهی مطرح گردند. با شناسایی این ژن‌های مؤثر و مسیرهای مرتبط با آن‌ها و با بکارگیری روش‌های آزمایشگاهی، می‌توان فرایندهایی که مانع پیشرفت میوز در تخمک‌هایی که ژنوم آن‌ها آسیب دیده یا اینکه توسعه سیتوپلاسمی آن‌ها ناقص است، می‌شوند را کنترل نمود.

منابع

1- Alexeyev, M. F., N. Venediktova, V. Pastukh, I. Shokolenko, G. Bonilla, and G. L. Wilson. 2008. Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes. Gene Therapy, 15(7):516–523.

2- Bader, G. D., M. P. Cary, and C. Sander. 2006. Pathguide: a pathway resource list. Nucleic acids research, 34(2):504–506.

3- Bavister, B. D, and J. M. Squirrell. 2000. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. Human Reporduction. 2:189-198.

4- Behdani, E, and M. R. Bakhtiarizadeh. 2017. Construction of an integrated gene regulatory network link to stress-related immune system in cattle. Genetica, 145(5):441-454.

5- Cantatore, p., Z. Flagella, F. Fracasso, A. M. S. Lezza, M. N. Gadaleta, and A. De Montalvo. 1987. Synthesis and turnover rates of four rat liver mitochondrial RNA species. FEBS Letters, 213(1):144-148.

6- Campoy, E, and M. I. Colombo. 2009. Autophagy in intracellular bacterial infection. Biochimica et Biophysica Acta, 1793(9):1465–1477.

7- Chargui, A. 2012. Subversion of autophagy in adherent invasive Escherichia coli-infected neutrophils induces inflammation and cell death. PLoS One, 7(12):1-10.

8- Chappel, S. 2013. The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. Obstetrics and Gynecology International, 2013(10):1-10.

9- Chen, X., R. Prosser, S. Simonetti, J. Sadlock, G. Jagiello, and E. A. Schon. 1995. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. The American Journal Human Genettics, 57(2):239–247.

10- Endo, T., H. Yamamoto, and M. Esaki. 2003. Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. Journal of Cell Science. 116:3259–3267.

11- Feniouk, B. A, and W. Junge. 2005 .Regulation of the F0F1-ATP synthase: the conformation of subunit epsilon might be determined by directionality of subunit gamma rotation. FEBS Letters, 579(23):5114-5118.

12- Ferreira, E.M., A. A. Vireque, P. R. Adona, F. V. Meirelles, R. A. Ferriani, and P. A .Navarro. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology, 71(5):836-848.

13- Fleckenstein, B., M. D. Daniel, R. D. Hunt, R. D. Werner, L. A. Falk, and C. Mulder. 1978. Tumour induction with DNA of oncogenic primate herpesviruses. Nature. 274:57–59.

14- Ghanem, N., M. Holker, F. Rings, D. Jennen, E. Tholen, M. A. Sirard, H. Torner, W. Kanitz, K. Schellander, and D. Tesfaye. 2007. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. BMC Developmental Biologhy. 7:90.

15- Gomes, L. C, and I. Dikic. 2014. Autophagy in antimicrobial immunity. Molecular Cell, 54(2):224–233.

16- Israel, M. A., H. W. Chan, S. L. Hourihan, W. P. Rowe, and M. A. Martin. 1979. Biological activity of polyomavirus DNA in mice and hamsters. Journal Virologhy. 29:990–996.

17- Jansen, R. P, and K. de Boer .1998. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. Molecular and Cellular Endocrinologhy, 145(1):81-88.

18- Kenmochi, N., T. Suzuki, T. Uechi, M. Magoori, M. Kuniba, S. Higa, K. Watanabe, and T. Tanaka. 2001. The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders. Genomics, 77(2):65-70.

19- Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. Journal of Animal Science. 82:14-23.

20- Labrecque, R. M., C .Vigneault, P .Blondin, and M. A. Sirard. 2013. Gene Expression Analysis of Bovine Oocytes With High Developmental Competence Obtained From FSH-Stimulated Animals. Molecular Reproduction & Development, 80(6):428–440.
21- Lapaquette, P., P .Brest, P .Hofman, and A .Darfeuille-Michaud . 2012. Etiology of Crohn's disease: many roads lead to autophagy. Journal of Molecoular Medicine, 90(9):987–996.
22- Liu, J., L. Jing, and X. TU. 2016. Weighted gene co-expression network analysis identifies specific modules and hub genes related to coronary artery disease. BMC Cardiovasc Disord, 5(16):54.
23- Lu, S., J. Arthos, D. C. Montefiori, Y. Yasutomi, K. Manson, F. Mustafa, E. Johnson, J. C. Santoro, J. Wissink, J. I. Mullins, J. R. Haynes, N. L. Letvin, M. Wyand, and H. L. Robinson. 1996. Simian immune deficiency virus DNA vaccine trial in macaques. Virology journal, 70(6):3978–3991.
24- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang .1998. Bid, a BCL2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell, 94(4):481-490.
25- Nagai, S., T. Mabuchi, S. Hirata, T. Shoda, T. Kasai, S. Yokota, H. Shitara, H. Yonekawa, and K. Hoshi. 2006. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. The Tohoku Journal Experimental Medicine, 210(2):137-144.
26- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell, 95(3):379-391.
27- Nicholls, D. G., S. J. Ferguson, and S. Ferguson. 2003. Bioenergetics. Third Edition.
28- Nishi, Y., T. Takeshita, K. Sato, and T. Araki. 2003. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during in vitro maturation. Journal of Nippon Medical School, 70(5):408-415.
29- Nivet, A. L., A. Bunel, R. Labrecque, J. Belanger, C. Vigneault, P. Blondin, and M. A. Sirard. 2012. FSH with drawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. Reproduction, 143(2):165-171.
30- Novak, I. 2012. Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. Antioxidants & Redox Signaling, 17(5):794–802.
31- Ohta, S., H. Tomura, K. Matsuda, and Y. Kagawa. 1988. Gene structure of the human mitochondrial adenosine triphosphate synthase beta subunit. The Journal Of Biological Chemistry, 263(23):11257–11262.
32- Patel, O. V., A. Bettegowda, J. J. Ireland, P. M. Coussens, P. Lonergan, and G. W. Smith. 2007. Functional genomics studies of oocyte competence: Evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. Reproduction, 133(1):95-106.
33- Peddinti, D., E. Memili, and S. C. Burgess. .2010. Proteomics-Based Systems Biology Modeling of Bovine Germinal Vesicle Stage Oocyte and Cumulus Cell Interaction . PLoS One, 5(6):1-13.
34- Riquelme Medina, I, and Z .Lubovac-Pilav .2016. Gene Co-Expression Network Analysis for Identifying Modules and Functionally Enriched Pathways in Type 1 Diabetes. PLoS One, 11(6):1-18.
35- Segal, E., N. Friedman, N. Kaminski, A. Regev, and D. Koller. 2005. From signatures to models: understanding cancer using microarrays. Nature Genetics, 37 (l):38-45.
36- Shuster, R. C., A. J. Rubenstein, and D. C. Wallace. 1988. Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 155(3):1360-1365.
37- Springer, M. Z, and K. F. Macleod .2016. Mitophagy: mechanisms and role in human disease. The Journal of Pathology, 240(3):253–255.
38- Stojkovic, M., S. A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P. B. Gonçalves, and E. Wolf. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biology of Reproduction, 64(3):904–909.
39- Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens, and G. Kroemer. 1996. BCL-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. Journal. Experimental. Medicine, 184(4):1331-1341.
40- Uddin, R. K, and S. M Singh. 2013. Hippocampal gene expression meta-analysis identifies aging and age-associated spatial learning impairment (ASLI) genes and pathways. PLoS One, 8(7):1-15.
41- Van Blerkom, J .1991. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. Proceedings National Academy of Sciences USA, 88(11):5031–5035.
42- Van Blerkom, J. 2004. "Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. Reproduction, 128(3):269–280.
43- Wallace, D. C. 2001. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. Novartis Foundation Symposia. 235:247-263.
44- Wilding, M., B. Dale, M. Marino, L. di Matteo, C. Alviggi, M. L. Pisaturo, L. Lombardi, and G. De Placido. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. Human Reproduction, 16(5):909-917.

45- Yuk, J. M., T .Yoshimori, and E. K. Jo. 2012. Autophagy and bacterial infectious diseases. Experimental and Molecular Medicine, 44(2):99-108.
46- Zhang, X., X. Q. Wu, S. Lu, Y. L. Guo, and X. Ma. 2006. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. Cell Research, 16(10):841–850.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 2, Summer 2020, p. 251-264

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۶۴-۲۵۱

Identification Of Mitochondrial Genes Affecting The Development Of Oocyte Under FSH Hormone By Using A Microarray Data In Cow

G. Farhadi[1], H. Roshanfekr[2]*, J. Fayazi[3], M. Nazari[4], E. Behdani[5]

Submitted: 19-07-2018
Accepted: 24-08-2019

Introduction Oocyte maturity includes nuclear and cytoplasmic maturity, both of which are important for embryo fertilization. Cytoplasmic maturation involves the redistribution of a range of organelles, including mitochondria. The nuclear and cytoplasmic mammalian oocytes maturation is a complex process nuclear maturation is demonstrated by extrusion of first polar body while there may be no indication for cytoplasmic maturation According to critical role of mitochondria for energy production in oocytes, it can be considered as an indicator of cytoplasmic maturation. Oocyte maturation requires more energy. Energy reaches its peak during ovulation. Changes in the mitochondrial distribution pattern can affect the ability of embryo development from oocytes. Since fetal mitochondrial replication is not performed until the blastocyst its stage, mature Oocytes (MII), fertilized Oocytes, Energy required for fertilization, embryonic development prior to implantation and early stages of fetal development depend on the storage of mitochondria in the time of ovulation. Therefore, the location and function of mitochondria can affect the quality of the Oocyte and consequently interfere with the process of embryo development. The topic of genetic networks explores the most important genes in a physiological process. The graph theory is used to construct and reconstruct the biology network. In biology networks, genes, proteins, or any other molecule that plays a role in a cell can be considered as a node and the relationship between these nodes is considered as an edge.

Materials and Methods In this study, GEO access codes for this data set GSE38345 were used to determine the effect of FSH on the expression of mitochondrial genes. In the past decade, with the ability to study genetic information of the genome in a wide range, micro arrays were a high-performance method for analyzing gene expression. The data are microarray and contain the gene expression information for cow's oocyte cells, whose maturity is influenced by the FSH hormone under laboratory conditions. After data implementation, the quality of the data was analyzed and if necessary, normalization was performed using the data conversion technique. Data analysis and comparison of gene expression in two cases before maturation (20 hours after oocyte treatment with FSH in laboratory conditions) and after maturation (96 hours after oocyte treatment with FSH in laboratory conditions) using From the GEO2R software link were done. After identifying the genes and examining the different genes expressed, two genotypes included Increased and decreased expression genes. The interaction of each gene group was studied using a string database based on co-expression data. Gene ontology was performed using the comparative GO database.

Results and Discussion In a comparison between oocyte gene expression data in the pre-maturation stage and the post-maturation stage after treatment with FSH, it was determined that 100 mitochondrial genes in maturation compared to pre-maturation stage increased expression and 94 genes of this organ has declined. Among them, the protein interaction network has been identified in a set of increased and decreased expression genes. Of the 100 genes that have been increased expression, 68 genes are coexpression based on string information. Among decreased expression genes, 53 genes from 64 genes were reported as coexpression. In the protein interaction network of the increased expression genes, the important genes of MRPS10, MRPS18A,

1 and 5- Ph.D.Graduate Student of Animal Breeding, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
2-Professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
3- Associate professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
4-Assistant professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
(*- Corresponding Author Email: roshanfekr_hd@cua.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i2.73776

MRPL16 and MRPL17, which played a role in the mitochondrial destruction and translation processes of mitochondrial genes, and in the network of decreased expression genes, MRPL22, ATP5B and ATP5C1 genes, which by reducing its expression, attempted to balance in the pathways associated with mitochondrial destruction and ATP production through its role in the ATP synthase structure.

Conclusion The results of this study reveal the most important genes affecting mitochondrial activity during oocyte maturation and control genes of this organ according to the network of protein interactions in the set of increased and decreased expression genes. In addition, the most important biological pathways in order to understand the mechanism of FSH effect on oocyte maturation through mitochondrial organ is investigated. Also, by comprehensive examining the gene expression network in the process of cytoplasmic oocyte maturation and showing the marker genes and different biochemical pathways, it is possible to understand the quality of oocyte during maturation, which can help improve IVM-IVF technique. Since effective mechanisms in cytoplasmic maturity are not yet fully understood, efforts to identify important regulators of mitochondria in oocyte maturation process will be effective in using fertility technology in animal production.

Key words: FSH, Microarray Data, Mitochondrial Genes, Oocyte Evolution.